云南植物研究 2009，31 (4)：335～343
Acta Botanica Yunnanica DOI：10.3724 SP.J.1143.2009.09013

农杆菌介导的甜菜碱醛脱氢酶基因转化甘蓝的研究

周国雁[1,2]，杨正安[3]，张应华[3]，郭凤根[3]，周晓罡[1,2]，
张绍松[1,2]，孙茂林[1,2]，伍少云[1,2]，丁玉梅[1,2]
（1 云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所，云南 昆明 650223；2 云南省农业生物技术重点实验室，
云南 昆明 650223；3 云南农业大学园林园艺学院，云南 昆明 650201）

摘要：为获得抗旱和耐盐性提高的甘蓝植株，通过农杆菌介导法将来自菠菜的甜菜碱醛脱氢酶（Betaine Aldehyde Dehydrogenase，*BADH*）基因导入甘蓝品系 03079，并采用正交设计优化影响转化效率的参数，建立了甘蓝高效转化体系，即以侵染液为 AA 液体培养基、乙酰丁香酮 200 μmol L^{-1}、侵染时间 20 min、共培养天数 2 d 为最佳转化参数，在该条件下转化率可达 54.26%。转基因甘蓝植株经 PCR 检测初步说明 *BADH* 基因已导入甘蓝中，Southern 杂交证明 *BADH* 基因已稳定整合到甘蓝基因组中。甜菜碱脱氢酶活性测定结果表明，经过聚乙二醇（PEG）、NaCl 和干旱处理的转基因甘蓝植株的 *BADH* 酶的平均比活力范围在 2.1 U mg^{-1}～3.6 U mg^{-1} 之间，不同处理的转基因株系酶比活力显著高于相应的未转基因株系。膜的相对电导率测定结果说明，经过 PEG、NaCl 和干旱处理的转基因植株平均相对电导率在 16.2%～32.6% 之间，耐逆境胁迫处理后的绝大多数转基因株系相对电导率显著低于相应对照。多数转 *BADH* 基因甘蓝植株在干旱、盐胁迫和 PEG 胁迫条件下生长势强于未转基因植株，表现为大多数转基因株系株高增幅显著高于对照，说明 *BADH* 基因的导入能提高转基因甘蓝植株的抗旱和耐盐性。我们获得的抗旱和耐盐能力明显提高的转基因甘蓝植株，可作为培育耐盐、抗旱甘蓝品种的种质材料。

关键词：甘蓝；农杆菌介导法；*BADH* 基因；抗旱；耐盐；转基因植株
中图分类号：Q 943　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0253-2700 (2009) 04-335-09

Agrobacterium tumefaciens-mediated Transformation of Cabbage with Betaine Aldehyde Dehydrogenase Gene

ZHOU Guo-Yan[1,2]，YANG Zheng-An[3]**，ZHANG Yin-Hua[3]，GUO Feng-Gen[3]，
ZHOU Xiao-Gang[1,2]，ZHANG Shao-Song[1,2]，SUN Mao-Lin[1,2]，
WU Shao-Yun[1,2]，DING Yue-Mei[1,2]***
（1 *Biotechnology and Germplasm Institute*，*Yunnan Academy of Agriculture Science*，Kunming 650223，China；
2 *Key Laboratory of Agricultural Biotechnology of Yunnan*，Kunming 650223，China；
3 *College of Horticulture and Landscape*，*Yunnan Agricultural University*，Kunming 650201，China）

Abstract：Cabbage（*Brassica oleracea* var. *capitata*）is one of the most popular and widely cultivated vegetable crops in the world. In this paper，*BADH*（betaine aldehyde dehydrogenase）gene derived from spinach was transformed into the genome of cabbage line 03079 mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. To establish the ideal transformation platform，the main factors which affect the transformation efficiency were optimized through the orthogonal design of L_9 (3^4)，including the type of infection medium，concentration of acetosyringone，the period of infection time and co-culture time. The results indicat-

---

基金项目：国家自然基金项目（30571275）；云南省自然科学基金（2008CD125；2006C0062M）
杨正安与周国雁对本论文有相同贡献
通讯作者：Author for correspondence；E-mail：ymding@163.com
收稿日期：2009-01-20，2009-03-28 接受发表
作者简介：周国雁（1982-）女，研究实习员，硕士，主要从事作物种质资源保存与创新研究。E-mail：yanguozhou@126.com

ed that No.9 was the best treatment combination, i.e, AA liquid medium was the optimal infection medium for the cabbage transformation, and co-culturing for 2 days after infection (20 min) would be favorable for the transformation. If supplemented with 200 μmol L^{-1} acetosyringone in infection medium, the transformation efficiency would be improved and the transformed plant regenaration ratio reached at 54.26%. Based on this optimal transformtion system, we obtained many transgenic plants, and PCR analysis using BADH gene primers and Southern blot analysis indicated that the *BADH* gene had been integrated into genome of cabbage. The *BADH* enzymes activity of transgenic plants were tested after treated with NaCl, drought-tolerance and PEG stress. The results showed that the average values of the activity of *BADH* enzymes, which varied from 2.1 U to 3.6 U per mg in transgenic plants, were 1 to 3 times higher than that of un-transgenic plants, and there was a significant difference between transgenic and un-transgenic plants using Duncan′s Multiple Range Test. Furthermore, the average value of relative electronic conductivity (varying from 16.2% to 32.6%) of transgenic plants were significantly lower than that of un-transgenic plants, which indicated that the protection ability of membrane penetration was enhanced when *BADH* activity increasing and the stress resistance of the transgenic plants was improved by introduction *BADH* gene into cabbage. At the same time, most of the transgenic cabbage plants were vigrously growing under drought 、 salt and polyethylene glycol (PEG) stresses. The average height increasing percentage of transgenic plants were significantly higher than that of un-transgenic plants. Those results showed that the traits of drought or salt tolerance of transgenic cabbage plants were improved after transformed with *BADH* gene, and our transgenic plants would be used as fundamental germplasm for stress-tolerant breeding of cabbage.

Key words: *Brassica oleracea* var. *capitata*; *Agrobacterium tumefaciens*-mediated; BADH gene; Drought-tolerance; Salt-tolerance; Transgenic plant

干旱和土壤盐渍化是农作物减产的主要原因之一，利用生物工程技术来培育抗旱、抗盐碱的农作物品种被认为是解决问题的有效途径之一。自然界中存在一些抗盐碱、抗旱植物，它们在长期抵御外界干旱和盐碱胁迫环境下形成了一定的适应机制。其中，最为常见的适应机制是积累与代谢相容的渗透保护性物质，如多元醇类、脯氨酸和季氨类化合物等（Yancey 等，1982）。植物甜菜碱是季氨类化合物的一种，被认为是生物体中起无毒渗透保护作用的最主要的细胞相溶性物质。在研究过的150多种代谢物中，甜菜碱是最好的渗透调节剂，且合成途径简单，甜菜碱醛脱氢酶（*BADH*）是合成甜菜碱的关键酶（Hanson and Rhodes，1983），甜菜碱合成酶基因是最重要和最有希望的胁迫抗性基因之一。研究者们已将不同来源的*BADH*基因转入烟草（赵宇纬等，2008）、水稻（Sakamoto and Murata，1998；刘凤华等，1997）、大麦（Ishitani 等，1995）、小麦（郭北海等，2000）、番茄（Jia 等，2002）、豆瓣菜（李银心等，2000）等作物中，得到了抗旱耐盐能力提高的转基因植株。最近，罗晓丽等（2007）将来源于山菠菜的*BADH*基因导入棉花提高了其抗冻耐逆能力。胡冬南等（2008）证明转*BADH*基因美丽胡枝子在NaCl胁迫下能积累较多的甜菜碱。韩德俊等（2007）将来自山菠菜的*BADH*基因导入甘蓝型油菜（*Brassica nupas* L.），表明转化体植株的*BADH*酶活性明显高于对照。

甘蓝（*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.）属十字花科芸薹属植物，是广泛种植的一种重要蔬菜，全国种植面积约80万公顷，是栽培最多的蔬菜之一（刘英和王超，2006）。甘蓝根系较浅，外叶多，水分蒸发量大，需水多，若在整个生育期中遇到干旱或盐胁迫，会导致其产量和品质的下降。本研究利用含菠菜*BADH*基因的植物表达载体，采用农杆菌介导法将*BADH*基因导入甘蓝，以期获得抗旱或耐盐性增强的甘蓝转基因植株，为今后培育耐盐、抗旱甘蓝品种提供新种质材料。

1 材料和方法

1.1 实验材料、菌株和基因质粒

供试材料为甘蓝品系03079，由西南大学园艺园林学院提供。根癌农杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）菌株为LBA4404，由本实验室保存；含有*BADH*基因的转化载体pBIBB由甘肃农业大学张宁博士惠赠，在通用植物表达载体pBI121基础上构建完成，筛选标记基因为卡那霉素抗性基因。含pBIBB的农杆菌单菌落于LB液体培

养基中过夜培养，以 1∶100 稀释培养 4 h，达到对数生长期后用于转化。

Taq 酶和 DNA Marker 购自 TIANGEN 公司；引物由上海生物工程公司合成；6-BA、α-NAA、甜菜碱醛购自 Sigma 公司；羧苄青霉素（Carb）和卡那霉素（Kan）购自 Amersco 公司；其他常规化学试剂均为国产分析纯试剂。

1.2　农杆菌法甘蓝高效遗传转化体系的建立

在无菌条件下用 0.1％升汞处理甘蓝种子 10 min，接于 MS_0 培养基（无任何添加物）上，暗培养 7 d，切取下胚轴用于转化。采用正交设计法研究影响转化效率的各种转化参数（乙酰丁香酮浓度、侵染培养液选择、侵染时间和共培养天数）对甘蓝抗性芽分化率的影响，确定最佳的转化参数。不同转化参数指标构成了四因素三水平 L_9（3^4）正交设计，共有 9 个处理，每个处理设 3 次重复，具体方案见表 1、2。

转化率计算：转化率 = 分化的抗性外植体数 接种外植数 100%

方差分析：运用 DPSv3.01 专业版统计软件，对不同处理间形成的转化率进行方差分析。

1.3　转基因抗性植株的筛选和再生

经侵染后的下胚轴接种在筛选培养基上，筛选培养基为 MS + BA 3 mg L^{-1} + NAA 0.05 mg L^{-1} + Kan 50 mg L^{-1} + Carb 250 mg L^{-1} + 蔗糖 30 g L^{-1} + 琼脂粉 8 g L^{-1}，pH5.8。将每个处理材料置于 25℃培养箱中培养，每天光照 10～12 h，光强为 37.5 μmol m^{-2} s^{-1}，经常观察外植体的变化，5 周后统计分化的抗性外植体数。

1.4　转基因初筛植株的生根和定植

当转基因初筛苗长到 4～5 cm 时在超净工作台内选取分化较好、生长健壮的甘蓝抗性芽进行分株，于生根培养基（MS + NAA 0.02 mg L^{-1} + Carb 250 mg L^{-1} + 蔗糖 30 g L^{-1} + 琼脂粉 8 g L^{-1} pH5.8）内生根，置于 23℃培养箱中培养，每天 10～12 h 光照，待苗长到约 10 cm 高时进行练苗，打开瓶盖 2～3 d 后，洗净培养基，定植于温室。

1.5　转基因植株的 PCR 检测

用 CTAB 法（Scott and Arnold，1985）提取转基因卡那抗性植株 DNA，未经转化植株作阴性对照，进行 PCR 检测。根据 BADH 基因序列，设计引物 B1：ATGGCGTTCCCAATTCCTGC 和 B2：AGTCAAGGAGACTTGTACC。以未转化植株作阴性对照，质粒 pBIBB 作阳性对照，PCR 反应体系的总体积为 25 μl，ddH_2O 17 μl，10 × buffer 2.5 μl，2.5 mmol L^{-1}，dNTP 2 μl，10 mmmol L^{-1} 引物 1 0.5 μl，*Taq* 酶 0.5 μl，模板 DNA 2 μl。PCR 扩增程序为 95℃，3 min；94℃，1 min；52℃，1 min；72℃，2 min，34 个循环；72℃延伸 10 min。取反应产物 10 μl 进行电泳检测。

1.6　Southern 杂交检测

参照朱华晨等（2004）的方法，结合 Roche 公司 DIG High Prime DNA Libeling and Detection Starter Kit I 使用手册进行，有部分改进：（1）凝胶转膜采用 JY-SCZ2 型垂直电泳槽进行；（2）使用地高辛非放射性检测系统取代放射性检测。

表 1　甘蓝转化参数因子和水平设计表

Table 1　The design of three levels of different factors for cabbage transformation

水平 Level	A（侵染液类型） Type of infection medium	B（乙酰丁香酮浓度） Concentration of Ace（μmol L^{-1}）	C（侵染时间） Infection time（min）	D（共培养天数） Co-infection time（d）
1	MS_0	0	10	2
2	MS + BA 3 mg L^{-1} + NAA 0.05 mg L^{-1}	100	20	3
3	AA	200	30	4

表中 AA 侵染液成分参见 Hiei 等（1994）　The formula of AA medium is described as Hiei（1994）

表 2　甘蓝转化参数 L_9（3^4）正交试验设计表

Table 2 The orthogonal design L_9（3^4）of factors for cabbage transformation

因子 Factor	处理 Treatment								
	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ	Ⅵ	Ⅶ	Ⅷ	Ⅸ
A	MS_0	MS_0	MS_0	MS + BA 3 + NAA 0.05	MS + BA 3 + NAA 0.05	MS + BA 3 + NAA 0.05	AA	AA	AA
B（μmol L^{-1}）	0	100	200	0	100	200	0	100	200
C（min）	10	20	30	20	30	10	30	10	20
D（d）	2	3	4	4	2	3	3	4	2

表中因子 A 代表侵染液类型，B 为乙酰丁香酮浓度，C 为侵染时间，D 为共培养天数。下同

The factor A means type of infection medium，B is the concentration of acetosyringone，C is infection time，and D represents co-culture time in *Agrobacterium* mediated transformation of cabbage . The same as following

1.7 转基因甘蓝生理生化指标测定

1.7.1 转基因甘蓝甜菜碱醛脱氢酶酶活性测定 测定Southern检测为阳性的转基因株系植株，取耐胁迫处理后的转基因甘蓝植株和未转基因植株叶片2 g，磨碎后加3 ml蛋白提取液（50 mmol L^{-1} Tris-HCl（pH8.0）+1 mmol L^{-1} EDTA +5 mmol L^{-1} DTT)，静置15 min，在4℃下12 000 r min^{-1}离心10 min。甜菜碱醛脱氢酶酶活性反应总体积为400 μl，含有蛋白提取液（200 mmol L^{-1} Tris-HCl (pH8.0)、4 mmol L^{-1} EDTA、20 mmol L^{-1} DTT) 75 μl、10 mmol L^{-1}甜菜碱醛40 μl、10 mmol L^{-1} NAD 40 μl、100 μl粗蛋白及H_2O 145 μl。以煮沸5 min的酶提取液为空白对照，反应在37℃下进行，时间10 min，紫外分光光度计340 nm处比色测定。上述条件下每分钟消耗1 nmol L^{-1} NAD为1个酶活力单位U，比活力为每毫克蛋白质中所含的酶活力单位（U mg^{-1}）。

1.7.2 转基因植株相对电导率的测定 测定Southern检测为阳性的转基因株系植株，称取耐胁迫处理后的转基因甘蓝植株和未转基因植株叶片0.2 g，加5 ml超纯水。每株准备两等份，一份于25℃，100 r min^{-1}振荡4 h，测定的电导率读数定为Rc′；另一份于沸水浴中加热30 min，测定的电导率读数定为Rc。相对电导率按以下公式计算：相对电导率（%）=(Rc′Rc)×100%。

1.8 转基因植株抗旱性和耐盐性鉴定

定植的转基因苗和对照的株高（Southern检测为阳性的株系）在15～20 cm时，进行胁迫处理，转基因株系和对照均取3个植株的平均值，每个株系设3次重复。第1组为不浇水干旱胁迫，处理10 d；第2组为盐胁迫，用NaCl溶液浇灌植株，浓度从50 mmol L^{-1}开始，每天提高50 mmol L^{-1}，处理10 d后至终浓度500 mmol L^{-1}；第3组为PEG-6000模拟的干旱胁迫，连续10 d用15%PEG浇灌。未转基因植株也同时处理。处理前测定株高，胁迫处理10 d后测定相应株号的株高，对比得出株高增长数据，用株高增长百分率表示植株生长情况，同时测定转基因苗和对照正常管理（每天浇水）10 d后的株高增长数据。

2 结果与分析

2.1 农杆菌法甘蓝高效转化体系的建立

为了探明转化参数对甘蓝转基因转化效率的影响，我们进行了优化转化参数的正交试验设计，不同处理的下胚轴接种在筛选培养基中约2周后开始白化，同时有分化能力的下胚轴先形成米粒大小的绿色愈伤组织，3周后有绿色芽点产生，4～5周可分化出抗性芽，而非转化甘蓝苗发生白化，最后死亡。不同处理分化直观结果见图1，正交试验统计结果见表3，正交试验直观分析结果和SSR检验统计分析结果见表4，5。表3表明所有参试的处理均有抗性芽生成，不同处理转化率在24.17%～54.26%之间，其中Ⅸ号处理的甘蓝转基因的平均转化率最高，达到了54.26%，是其它处理的1.4～2.2倍。以Ⅸ号为最佳处理，以侵染液为AA培养基、乙酰丁香酮200 μmol L^{-1}、侵染时间20 min、共培养天数2 d为甘蓝高效转化体系的优化转化参数。

从表4可看出，A因素中A_3的转化率最高，B因素中B_3的转化率最高，C因素中C_2的转化率最高，D因素中D_1的转化率最高，将各因素的最优水平结合在一起预测出最优处理为$A_3B_3C_2D_1$，即侵染液为AA培养基、乙酰丁香酮200 μmol L^{-1}、侵染时间20 min、共培养天数2 d为最佳甘蓝转基因获得高效转化体系的优化转化参数，与实际试验的优处理相符。根据极差R的大小排列出各因子的影响主次顺序为C>A>B>D，即侵染时间对转化率的影响最大，侵染液类型影响次之，乙酰丁香酮和共培养天数的影响最小。通过对各处理间差异显著性SSR检验，

表3 甘蓝转化参数L_9（3^4）正交试验统计结果

Table 3 The results of the orthogonal design L_9（3^4）of factors for cabbage transformation

处理 Treatment	外植体数 Number of explants			分化的抗性外植体数 Number of differentiation of resistance explants			平均转化率（%） The average transformation rate
	i	ii	iii	i	ii	iii	
Ⅰ	40	40	42	15	6	14	28.61
Ⅱ	50	62	62	9	22	22	29.66
Ⅲ	45	42	56	11	11	19	28.19
Ⅳ	44	41	30	19	14	11	38.00
Ⅴ	41	42	39	6	19	14	31.92
Ⅵ	40	39	49	16	10	12	30.04
Ⅶ	44	41	43	15	18	15	37.63
Ⅷ	38	41	51	14	9	7	24.17
Ⅸ	45	51	36	27	17	25	54.26

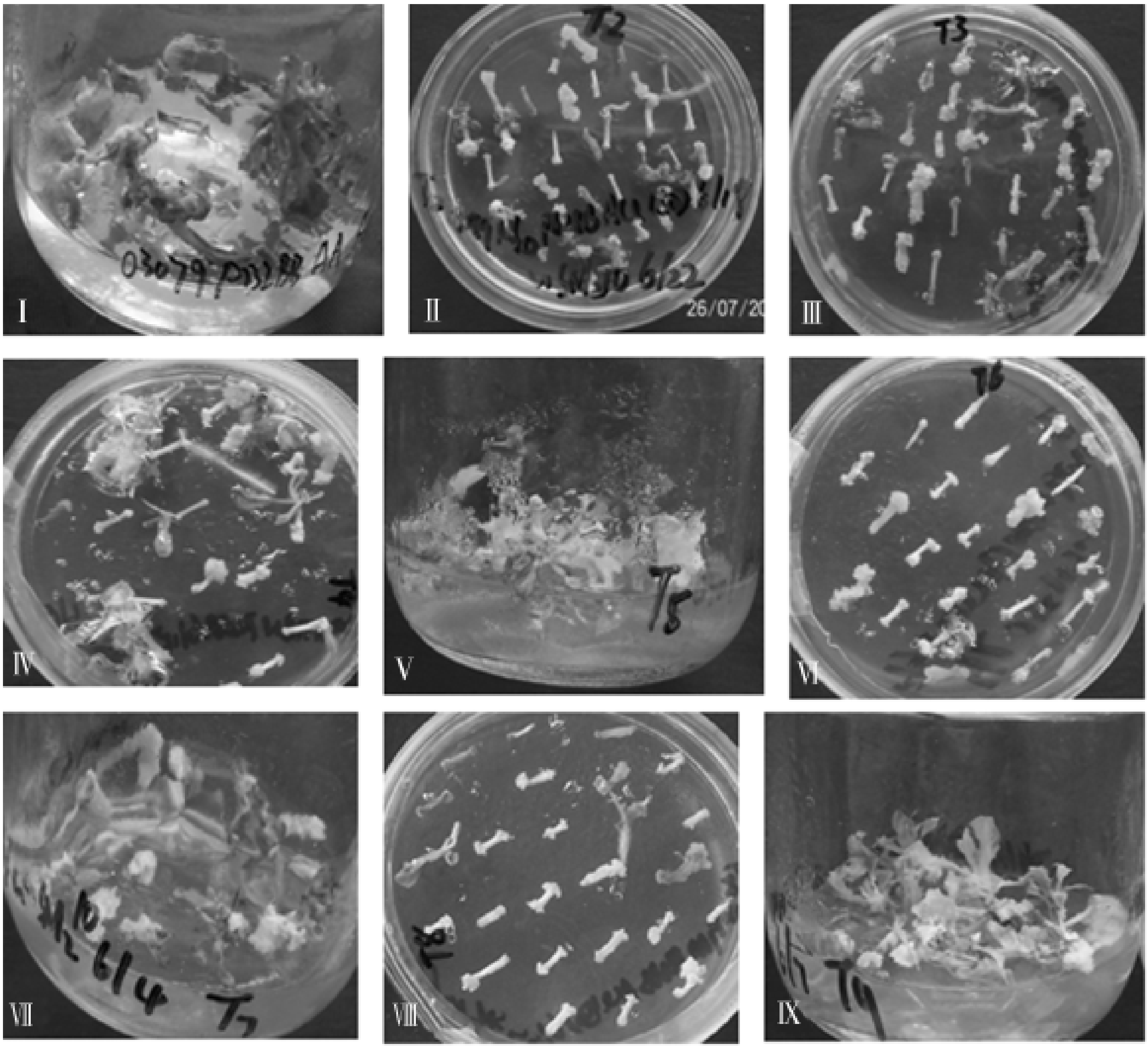

图 1　正交试验设计 9 个处理甘蓝转基因抗性苗分化情况

Fig .1　Regeneration of antibiotic-resistant shoots of cabbage by the orthogonal design in selection medium

表 4　甘蓝转化参数 L_9 （3^4）正交试验直观分析结果

Table 4　The visual analysis of the orthogonal design L_9 （3^4） of different factors for the cabbage transformation

因子 Factor	总和 sum			均值 average			极小值 minimum	极大值 maximum	极差 R margin R	调整 R' adjustment R′
	水平 1 level 1	水平 2 level 2	水平 3 level 3	水平 1 level 1	水平 2 level 2	水平 3 level 3				
A	86.46	99.96	116.06	28.82	33.32	38.69	28.82	38.69	9.87	8.89
B	104.24	85.75	112.49	34.75	28.58	37.50	28.58	37.50	8.91	8.03
C	82.82	121.92	97.74	27.61	40.64	32.58	27.61	40.64	13.03	11.74
D	114.79	97.33	90.36	38.26	32.44	30.12	30.12	38.26	8.14	7.33

Ⅸ处理和其余处理差异差均达到了显著水平；处理Ⅸ的甘蓝转基因转化率 54.26%最高，和Ⅷ处理组合比较，差异达到极显著水平（表5）。

2.2　转基因甘蓝植株 PCR 检测和 Southern-blot 分析

用 *BADH* 基因两端引物，将 200 株甘蓝卡那抗性植株进行 PCR 扩增检测，结果有 50 株有 1.5 kb 的特异扩增带，PCR 检测阳性率为 25.0%，部分抗性植株的 PCR 扩增结果见图 2。PCR 结果初步表明，*BADH* 基因已整合到甘蓝基因组中。

提取 PCR 检测为阳性的转化植株的 DNA，分别用 *Sac* Ⅰ进行酶切 9 h 以上，电泳分离后进行 Southern 杂交。图 3 结果显示，阴性对照、2 号，3 号株系没有出现杂交信号，阳性对照和 Kan

表 5 甘蓝转化参数不同处理组合 SSR 检验

Table 5 SSR analysis of different treatment of factors of cabbage transformation

处理 Treatment	Ⅸ	Ⅳ	Ⅶ	Ⅴ	Ⅵ	Ⅱ	Ⅰ	Ⅲ	Ⅷ
均值 average	54.26	38.00	37.63	31.92	30.04	29.66	28.61	28.19	24.17
$P < 0.05$	a	ab	ab	b	b	b	b	b	b
$P < 0.01$	A	AB	AB	AB	AB	AB	AB	AB	B

$P < 0.05$ 表示 5%显著水平; $P < 0.01$ 表示 1%显著水平。

$P < 0.05$ means significant level at 5%; $P < 0.01$ represents very significant level at 1%.

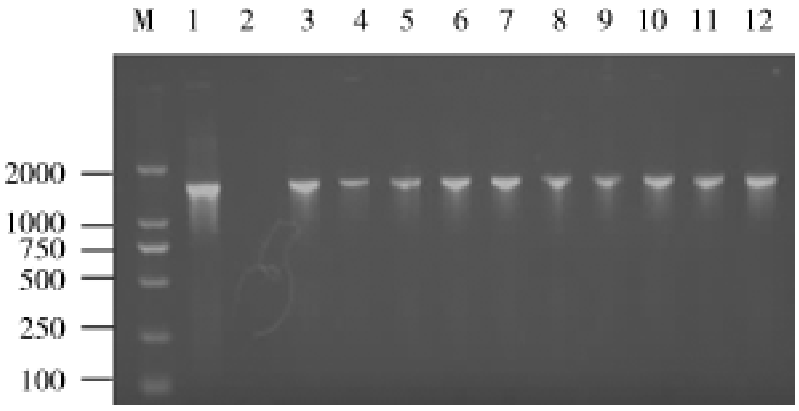

图 2 甘蓝转基因植株的 PCR 检测

M: DNA 标准分子量; 1. 质粒阳性对照;

2. 未转化植株; 3～12. 阳性植株

Fig. 2 Confirmation of the transgenic cabbage plants by PCR amplification

M: DL2000 marker; 1. plasmid pBIBB; 2. untransformed

plants; 3-12: transgenic plants

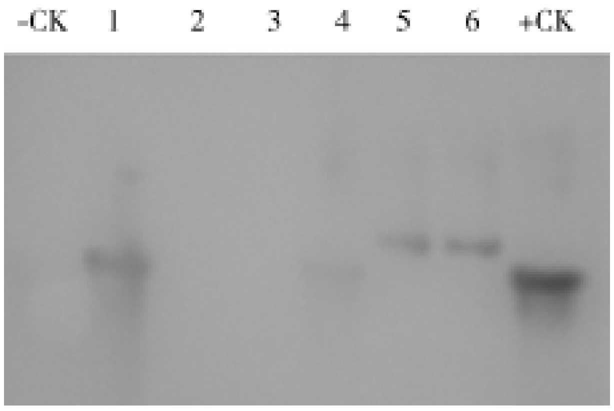

图 3 转 *BADH* 基因植株的 Southern 杂交

-CK. 未转化植株; 1～6. PCR 阳性植株; + CK. 质粒对照

Fig. 3 Southern bloting analysis of *BADH* gene

in transgenic plants

-CK. untransformed plants; 1-6. PCR-positive plants;

+ CK. plasmid pBIBB

抗性的 1 号, 4 号、5 号、6 号株系出现了一条杂交带 (4 号杂交信号相对较弱), 说明目的基因 *BADH* 已稳定整合到 1、4、5 号和 6 号 4 个株系的基因组中, 并且是单拷贝插入。

2.3 转基因甘蓝生理生化指标测定结果

2.3.1 转基因甘蓝甜菜碱醛脱氢酶酶活性测定

为了检测外源 *BADH* 基因在甘蓝中的表达情况, 对干旱盐碱胁迫的受试植株进行 BADH 酶活性测定, 并对株系间酶活性差异进行显著性检验, 结果如表 6。可以看出, 经过 PEG、NaCl 和干旱处理的转基因植株的 BADH 酶平均比活力范围在 2.1 U mg^{-1}～3.6 U mg^{-1}之间, 不同处理的转基因株系酶比活力与相应的未转基因株系差异均达到了显著水平, PEG 和干旱处理的不同株系之间酶活性差异较大, 而 NaCl 处理的转基因株系间的酶活性无显著差异。这说明转基因甘蓝在受到逆境胁迫时, 能促进 *BADH* 基因的表达, 合成更多甜菜碱脱氢酶, 从而提高植株的抗盐和耐旱能力, 但不同的胁迫处理和不同株系中的 *BADH* 表达量存在差异。此外, 未转基因植株中的 BADH 酶的比活力范围在 1.3 U mg^{-1}～1.6 U mg^{-1}左右, 甘蓝本身含有内源的 *BADH* 基因, 但活力较低。

2.3.2 甘蓝转基因植株相对电导率测定结果

相对电导率测定结果及差异显著性分析见表 7, 经过 PEG、NaCl 和干旱处理的转基因植株平均相对电导率在 16.2%～32.6%之间, 而未转基

表 6 转基因甘蓝 *BADH* 酶活性测定

Table 6 The results of the BADH enzyme activity assay of transgenic cabbage

处理 Treatment	TBC1	TBC2	TBC3	TBC4	TBC5	WT Un-transgenic line	*P*
PEG	2.3±0.10c	2.3±0.35c	3.7±0.21a	2.9±0.10b	3.6±0.26a	1.6±0.10d	< 0.001
NaCl	3.5±0.20a	3.6±0.23a	3.6±0.12a	3.1±0.15a	3.0±0.23a	1.3±0.15b	< 0.001
不浇水 Drought	2.8±0.15b	2.5±0.10bc	2.1±0.21c	3.0±0.10ab	3.5±0.15a	1.4±0.26d	< 0.001

表中数据为 3 个重复的平均值±标准误; 采用 Duncan 法比较, 不同字母表示在 5% 水平上差异显著; 下同

The data were the means±SE of 3 separate measurements. Different letters mean significant at 5% level using Duncan's Multiple Range Test. The same as following.

表 7　甘蓝转基因植株相对电导率测定结果

Table 7　The results of the relative electronic conductivity of transgenic cabbage

处理 Treatment	TBC1	TBC2	TBC3	TBC4	TBC5	WT Un-transgenic line	*P*
PEG	24.6±2.22bc	25.4±0.92bc	27.4±0.52b	28.1±1.45b	22.2±0.80c	50.0±0.47a	<0.001
NaCl	16.3±1.31c	24.5±0.89b	22.4±1.50b	23.4±1.39b	21.4±1.55b	51.0±2.18a	<0.001
不浇水 Drought	16.2±0.61c	23.5±1.39b	32.6±1.44a	20.2±2.43bc	20.7±2.58bc	31.1±2.5a	<0.001

表 8　转基因甘蓝抗旱及耐盐性胁迫株高增长百分率

Table 8　The results of plant height increasing percentage of transgenic cabbage at drought and salt tolerances

处理 Treatment	TBC1	TBC2	TBC3	TBC4	TBC5	WT Un-transgenic line	*P*
PEG	4.5±0.60a	4.5±0.50a	0.0±0.03c	4.0±0.36a	2.0±0.46b	1.0±0.29bc	<0.001
NaCl	10.0±1.41a	5.0±0.50b	5.3±1.52b	5.5±0.79b	7.2±0.40b	1.2±0.20c	<0.001
不浇水 Drought	4.0±0.58a	1.2±0.38b	1.0±0.25b	5.0±0.46a	2.0±0.38b	1.5±0.29b	<0.001
正常生长 Normally growth	8.9	8.0	7.1	8.5	8.8	9.0	——

因植株相对电导率在31.1%～51.0%之间，经过PEG、NaCl处理的转基因株系相对电导率显著低于相应对照，而干旱处理后除株系3外，其余转基因株系相对电导率与对照差异达显著水平，说明转 *BADH* 基因甘蓝在受盐碱和干旱胁迫时，大多数植株能合成较多的甜菜碱来维持细胞正常渗透压，使细胞膜损害程度降低，反映为相对电导率低，植株抗旱耐盐性较对照有所提高。而不同株系间的相对率差异较大，耐胁迫能力也存在差异。

2.4　甘蓝转基因植株株高增长鉴定结果

5个转基因株系和对照在正常生长状态下，10 d后的株高增幅在7.1%～9.0%之间，而逆境胁迫下，转基因株系和对照植株生长均受到抑制。但在干旱胁迫、盐胁迫和PEG胁迫下，大多数转基因株系株高增幅显著高于对照，甘蓝生长状态比未转基因甘蓝植株良好，说明 *BADH* 基因的导入确实提高了转基因植株的抗旱耐盐性。需要说明的是，由于株高增幅是一个综合指标，影响株高增幅的因素较多，出现了转基因株系与对照差异不显著的情况。

3　讨论

在高等植物中，甜菜碱的合成途径相对简单，主要包含两步氧化反应，涉及到由胆碱单加氧酶（CMO）催化胆碱形成甜菜碱醛，而后由甜菜碱醛脱氢酶（BADH）催化形成甜菜碱，其中BADH是合成甜菜碱的关键酶。*BADH* 基因被认为是植物耐盐抗旱基因工程中的有效基因，广泛用于植物的耐盐转基因研究。韩俊德等（2007）将来源于山菠菜的 *BADH* 基因导入同属作物的甘蓝型油菜（*Brassica nupas* L.）中，得到耐100 mmol L^{-1} NaCl的转基因植株。Bhattacharya等（2004）已经将来源于大肠杆菌的 *BADH* 基因转化到甘蓝的栽培品种‘Golden Acre’中，提高了植株的耐盐能力，获得的转基因甘蓝能在NaCl浓度为300 mmol L^{-1} 的条件下生长。本研究利用来自菠菜的 *BADH* 基因增强了甘蓝的抗旱耐盐能力。可见，不同来源的 *BADH* 基因可以在甘蓝中得到表达，异源转基因的方式可以应用于甜菜碱醛脱氢酶抗旱耐盐基因工程。

十字花科芸薹属作物的遗传转化研究已取得重大进展，但在甘蓝遗传转化中存在转化率低、有假阳性植株等问题，如何大幅度提高转化率是利用基因工程进行遗传改良的关键问题。在前人的研究中，遗传转化体系的优化大都集中在农杆菌种类、菌液浓度、外植体的预培养时间、农杆菌侵染时间、共培养时间等几个因素，很少涉及侵染液类型这一因子，本实验的研究结果表明，除共培养时间外，侵染液类型是对转化效率影响较大的因素。AA侵染液在植物基因工程中应用首见于对水稻的遗传转化（Hiei等，1994）、（翟文学等，2000），我们将它运用于甘蓝后，可明显提高转化效率，其抗性植株再生率最高达到了54.26%，由于AA培养基含有多种氨基酸，可能促进了农杆菌和甘蓝下胚轴生长。此外，酚类物质可以诱导农杆菌vir基因的活化，vir基因的

表达控制着 T-DNA 的转移。本研究中，在甘蓝转化侵染时添加乙酰丁香酮是农杆菌介导的甘蓝转化率提高的一个因素，以乙酰丁香酮 200 μmol L^{-1} 为最适浓度。张宁等（2004）和梁慧敏等(2005) 的研究也表明，菌液中加入乙酰丁香酮能提高转化率。

本研究通过 PCR 和 Southern 杂交分子检测，证明 *BADH* 基因已整合到甘蓝基因组中。转基因株系中的 BADH 酶比活力显著高于野生型植株，在未转基因的甘蓝植株中也检测到 BADH 酶活性，这可能与其本身含有内源 *BADH* 基因有关，在余爱丽等（2005）的研究中，在 16 种植物的 18 个甜菜碱醛脱氢酶基因的系统进化树中，有十字花科的作物含有此基因，十字花科甘蓝属作物也可能含有内源的 *BADH* 基因，受试植株由于经过干旱和盐碱胁迫后自身会产生甜菜碱再加上导入外源 *BADH*，这时甜菜碱会超量积累，作为渗透调节物质发挥功能，也作为细胞的酶和蛋白质的保护物质发挥其非渗透调节功能，这样双效功能增强了转化植株的抗逆能力。同时，绝大多数转基因株系相对电导率显著低于野生型植株，经过逆境胁迫的转基因植株膜损伤小于未转基因植株，多数转基因株系的生长势强于野生型植株。

本研究通过正交设计优化了农杆菌法甘蓝最佳的转化参数，证明侵染时间对转化率影响最大，侵染液次之，乙酰丁香酮和共培养天数的影响最小，为利用农杆菌法将其它基因导入甘蓝提供了有价值的参考。同时，本文通过 *BADH* 基因的转化，创造了抗旱耐盐能力提高的甘蓝新种质，为培育抗旱耐盐新品种奠定了材料基础。我们已将 Southern 杂交阳性且抗旱耐盐性增强的甘蓝植株移植大田，收获了 T1 代种子，下一步将进行 T1 代植株的遗传稳定性和抗性检测。

致谢 甘肃农业大学张宁博士惠赠的转化载体 pBIBB；西南大学宋洪元博士提供高分化率的甘蓝品系 03079。

〔参考文献〕

Bhattacharya RC, Maheswari M, Dineshkumar V *et al.*, 2004. Transformation of *Brassica oleracea* var. *capitata* with bacterial betA gene enhances tolerance to salt stress [J]. *Scientia Horticulturae*, 100: 215—227

Guo BH (郭北海), Zhang YM (张艳敏), Li HJ (李洪杰) *et al.*, 2000. Transformation of wheat with a gene encoding for the betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) [J]. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 42 (3): 279—283

Han JD (韩德俊), Chen YF (陈耀锋), Li CL (李春莲) *et al.*, 2007. *Agrobacterium* mediated transformation with a gene encoding for betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) in *Brassica napus* [J]. *Agricultural Research in the Arid Areas* (干旱地区农业研究), 25 (4): 6—11

Hanson AD, Rhodes D, 1983. ^{14}C Tracer evidence for synthesis of choline and betaine via phosphoryl base intermediates in salinized sugarbeet leaves [J]. *Plant Physiology*, 71: 692—700

Hiei Y, Ohta S, Komari T *et al.*, 1994. Efficent transformation of rice (*Oryza Sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA [J]. *Plant Journal*, 6 (2): 271—282

Hu DN (胡冬南), Chen XY (陈晓阳), Li W (李伟) *et al.*, 2008. Transformation of *Lespedeza formosa* with *BADH* gene mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Scientia Silvae Sinicae* (林业科学), 44 (3): 76—80

Ishitani M, Nakamura T, Han SY *et al.*, 1995. Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid [J]. *Plant Molecular Biology*, 27: 307—315

Jia GX, Zhu ZQ, Chang FQ *et al.*, 2002. Transformation of tomato with the *BADH* gene from Atriplex improves salt tolerance [J]. *Plant Cell Reports*, 21: 141—146

Li YX (李银心), Chang FQ (常凤启), Du LQ (杜立群) *et al.*, 2000. Genetic transformation of watercress with a gene encoding for betaine-aldehyde dehydrogenase (BADH) [J]. *Acta Botanica Sinica* (植物学报), 42 (5): 480—484

Liang HM (梁慧敏), Xia Y (夏阳), Sun ZX (孙仲序) *et al.*, 2005. Establishment of genetic transformation system of *Medicago safiva* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology* (农业生物技术学报), 13 (2): 152—156

Liu FH (刘凤华), Guo Y (郭岩), Gu DM (谷冬梅) *et al.*, 1997. Salt tolerance of transgenic plants with BADH cDNA [J]. *Acta Genetica Sinica* (遗传学报), 24: 54—58

Liu Y (刘英), Wang C (王超), 2006. Brief description the origin and classification of Cabbage (*Brassica oleracea*) [J]. *Northern Horticulture* (北方园艺), 4: 57

Luo XL (罗晓丽), Xiao JL (肖娟丽), Wang ZA (王志安) *et al.*, 2008. Overexpression of spinacia oleracea betaine aldehyde dehydrogenase (SoBADH) gene confers the salt and cold tolerant in *Gossypium hirsutum* L. [J]. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 24 (8): 1464—1469

Sakamoto A, Murata NA, 1998. Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycinebetaine and tolerance to salt and cold [J]. *Plant Molecular Biology*, 38: 1011—1019

Scott OR, Arnold JB, 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummified plant tissues [J]. *Plant Molecular Biology*, 5: 69

Yancey PH, Clark ME, Hand SC *et al.*, 1982. Living with water stress: Evolution of osmolyte systems [J]. *Science*, 217: 1214—1222

Yu AL (余爱丽), Yao W (姚伟), Zhou H (周会) *et al.*, 2005. Cloning and sequencing of *BADHI* gene from *Sorghum vulgare* [J]. *Journal of Agriculturial Biotechnology* (农业生物技术学报), 13 (2): 256—257

Zhai WX (翟文学), Li XB (李晓兵), Tian WZ (田文忠) *et al.*, 2000. Regeneration of five Chinese rice varieties after trans-formation of a bacterial blight resistance gene *Xa*21 by using *Agrobacterium*-mediated system [J]. *Science in China* (Series C) (中国科学 (C辑)), 30 (2): 200—206

Zhang N (张宁), Si HJ (司怀军), Li XC (李学才) *et al.*, 2004. An efficient transformation syetem of potato mediated by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Chinese Potato* (中国马铃薯), 18 (3): 132—135

Zhao YW (赵宇玮), Hao JG (郝建国), Bu HY (步怀宇) *et al.*, 2008. Cloning of HvBADH1 gene from hulless barley and its transformation in *Nicotiana tabacum* [J]. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 34 (7): 1153—1159

Zhu HC (朱华晨), Xu XP (许新萍), Li BJ (李宝健), 2004. A simple rapid method of southern blot analysis [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni* (中山大学学报 (自然科学版)), 43 (4): 128—130

* * * * * * * * * * * * * * *

中国科技核心期刊、全国优秀农业期刊

《植物遗传资源学报》征订启事

《植物遗传资源学报》是中国农业科学院作物科学研究所和中国农学会主办的学术期刊，为全国中文核心期刊、中国科技核心期刊、全国优秀农业期刊。该刊为中国科技论文统计源期刊、中国科学引文数据库来源期刊（核心期刊)、中国核心期刊（遴选）数据库收录期刊、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊，又被《中国生物学文摘》和中国生物学文献数据库、中文科技期刊数据库收录。据中国期刊引证研究报告统计，2007年度《植物遗传资源学报》影响因子达0.914。

报道内容为大田、园艺作物，观赏、药用植物，林用植物、草类植物及其一切经济植物的有关植物遗传资源基础理论研究、应用研究方面的研究成果、创新性学术论文和高水平综述或评论。诸如种质资源的考察、收集、保存、评价、利用、创新，信息学、管理学等；起源、演化、分类等系统学；基因发掘、鉴定、克隆、基因文库建立、遗传多样性研究。

双月刊，大16开本，128页。定价20元，全年120元。各地邮局发行，邮发代号：82-643。国内刊号CN11-4996S，国际统一刊号ISSN1672-1810。本刊编辑部常年办理订阅手续，如需邮挂每期另加3元。

地址：北京市中关村南大街12号 中国农业科学院《植物遗传资源学报》编辑部　　邮编：100081

电话：010-82105794　010-82105796 (兼传真)　　E-mail：zwyczyxb2003@163.com；zwyczyxb2003@sina.com

欢迎订阅2010年《分子植物育种》

《分子植物育种》是一份为转基因育种、分子标记辅助育种及常规育种服务的科学杂志，也是中国唯一的一份以育种为名的科学杂志。于2003年创刊，创刊伊始即被美国化学文摘（CA)，中国科学引文数据库、中国科技期刊全文数据库、中国引文数据库，中国科技期刊数据库、中文科技期刊数据库，中国核心期刊（遴选）数据库，中国生物学文摘和中国生物学数据库等多家中外文献数据库收录。2008年中国CNKI影响因子达到1.23的新高度，中国自然科学核心期刊影响因子达到1.229的新起点。同时，《分子植物育种》已建立了全英文的期刊网站，定期发布学术动态、出版信息及期刊近期目录等，实现作者、编者、读者同步分享。

《分子植物育种》包括专题评述、研究论文、研究报告、专题介绍、学位论文简报、新基因新种质新品种、新思路新技术新方法和信息索引等栏目。主要围绕水稻、小麦、玉米、油菜、大豆、棉麻、薯类、果树、蔬菜、花卉、茶叶、林草等方面。《分子植物育种》已经成为植物育种及相关研究领域研究成果发表和交流的最重要学术平台，代表了目前中国分子植物育种的现实情况，是了解中国分子植物育种的一个重要窗口。

欢迎订阅《分子植物育种》，本刊单月28日出版，国内定价：￥40.00期，￥240.00年；国际定价：＄20.00期，＄120.00年。国内统一刊号：CN 46-1068 S，国际标准刊号：ISSN 1672-416X，邮发代号：84-23。读者可到当地邮局订阅，或直接汇款至编辑部，免收邮费。

地址：海南省海口市海秀大道128号双岛公寓13B室，邮编：570206　电话：0898-68966415　传真：0898-68958180

E-mail：mpb@hibio.org，mpb@molplantbreed.org　　http：www.molplantbreed.org